Plant Pathology Bulletin 21: 115-130

蝴蝶蘭鐮胞菌病害調查

蘇俊峯[1]、李怡靜[1]、陳純葳[1]、黃晉興[1]、謝廷芳[2,3]

[1] 臺中市 行政院農業委員會農業試驗所植物病理組

[2] 雲林縣 行政院農業委員會農業試驗所花卉研究中心

[3] 聯絡作者，E-mail：tfhsieh@tari.gov.tw；傳真：+886-5-5820834

接受日期：中華民國 101 年 5 月 18 日

摘 要

蘇俊峯、李怡靜、陳純葳、黃晉興、謝廷芳. 2012. 蝴蝶蘭鐮胞菌病害調查. 植病會刊 21：115-130.

本研究主要目的在於釐清鐮胞菌(*Fusarium* spp.)引起之蝴蝶蘭病害種類。經田間調查、病原菌分離與鑑定及接種試驗結果，顯示蝴蝶蘭植株發生葉片黃化、落葉，葉鞘或靠近葉鞘的裸露根部出現黑腐病徵，有時在罹病葉鞘與根部黑腐部位出現成堆的橙紅色子囊殼，為 *Fusarium solani* (有性世代為 *Haematonectria haematococca*) 所引起的黃葉病。蝴蝶蘭植株葉片與葉鞘出現不規則至圓形黑褐色病斑，病斑周圍有黃暈，病斑中間則出現灰白色病徵；若病斑出現於葉基部或葉鞘，則容易引起植株葉片黃化的病徵，係由 *F. oxysporum* 所引起的灰斑病。蝴蝶蘭植株葉鞘與葉片出現圓形至不規則形的黑色病斑，而有些品種的葉鞘被感染後，葉片有偏黃的現象，係為 *F. proliferatum* 所引起的黑斑病。將黑斑病菌 F0217-23 與 F925L7 菌株單獨接種時，供試植株並不會出現黃葉的病徵，但是與黃葉病菌 FST1 菌株混合接種時，供試植株則出現葉片黃化病徵。又將 FST1 菌株與灰斑病菌 N8284 菌株進行混合接種，結果兩者不論單獨或混合接種，皆會造成植株葉片黃化。進一步將 FST1、F0217-23 及 N8284 等菌株混合接種，植株會出現葉片黃化的病徵；然而，將 F0217-23 與 N8284 混合接種時，植株卻不會出現葉片黃化的病徵。在 24-28℃時三個供試菌株的菌絲生長速度，以 FST1 菌株最快，菌絲生長速度介於 4.8-5.3 mm/day，而 F0217-23 與 N8284 菌株之菌絲生長速度則介於 2.1-3.3 mm/day。

關鍵詞：蝴蝶蘭、黃葉病、黑斑病、灰斑病、*Fusarium solani*、*Haematonectria haematococca*、*Fusarium oxysporum*、*Fusarium proliferatum*

緒 言

台灣氣候適合蘭科植物生長，過去有賴業者自國外引進多樣化的蘭花種原，使台灣擁有世界最豐富的蘭科植物品種。近年來，隨著業者的努力與政府的輔導，提昇台灣蘭花生產技術的成熟度，尤其是在蝴蝶蘭 (*Phalaenopsis*) 的品種改良與栽培技術上的精進，促使台灣成為全球蝴蝶蘭的主要供應地區之一[20]。此外，由於組織培養、水苔介質栽培及溫室環控技術成熟，讓蝴蝶蘭成為可週年生產的旗艦花卉。台灣出口的蝴蝶蘭多以海運輸出，而海運的過程視外銷國的距離遠近往往需耗時 1-4 星期。在台灣輸美附帶栽培介質植物工作計畫書 (行政院農業委員會動植物防疫檢疫局 2010 年植物檢疫法規解釋函彙編，附件 19) 的規範下，美國允許台灣生產的蝴蝶蘭苗株可攜帶水苔栽培介質輸入。

然而病害的發生為蝴蝶蘭生產與外銷的限制因子之一，根據臺灣植物病害名彙的記載[5]，蝴蝶蘭病害包括灰黴病 (病原菌 *Botrytis cinerea*)、疫病 (病原菌 *Phytophthora parasitica, Phy. palmivora*)、炭疽病 (病原菌 *Colletotrichum gloeosporioides*)、淡色炭疽病 (病原菌 *Cylindrosporium phalaenopsidis*)、葉斑病 (病原菌 *Sphaerulina phalaenopsidis*)、細菌性軟腐病 (病原菌 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*)、細菌性褐斑病 (病原菌 *Pseudomonas cattleyae*)、蕙蘭嵌紋病毒 (*Cymbidium mosaic virus*, CymMV) 與齒舌蘭輪斑病毒 (*Odontoglossum ringspot virus*, ORSV) 等。在台灣輸美附帶栽培介質植物工作計畫書中定義輸美蝴蝶蘭植株不得檢測出之有害生物包括的真菌有淡色炭疽病菌 (*C. phalaenopsidis*)、葉斑病菌(*Phomopsis orchidophila*) 及葉斑病菌 (*S. phalaenopsidis*)。

近年來，在蝴蝶蘭栽培期間或在海運的運送過程中，植株經常出現葉片黃化、落葉，葉鞘出現黑褐色壞疽的病徵，有時在罹病株的葉鞘與根部的黑色壞疽部位，可觀察到成堆的橙紅色子囊殼，嚴重者甚至造成株植死亡，農民俗稱「黑頭」，此病害已嚴重降低蝴蝶蘭的育成率。一般認為，蝴蝶蘭栽培場內普遍發生由鐮胞菌 (*Fusarium* spp.) 所造成的「黃葉病」，病原菌可能包括 *F. solani*、*F. oxysporum* 與 *F. proliferatum* 等[4]。然而，Su 等人[17]認為在蝴蝶蘭上引起黃葉病 (Sheath and root rot of *Phalaenopsis*) 的病原菌僅有 *F. solani*，而 *F. oxysporum* 與 *F. proliferatum* 則可能造成其他不同病徵之病害。本研究初步田間調查發現，有些蝴蝶蘭罹病株在葉片與葉鞘部位出現黑色圓形至不規則形病斑，由罹病部位可分離得到 *F. proliferatum* 分離株；而有些蝴蝶蘭罹病株在葉片與葉鞘部位出現黑色或褐色圓形至不規則形病斑，病斑周圍帶有黃暈，繼之病斑中間轉為灰白色，由罹病部位可分離得到 *F. oxysporum* 分離株。因此，本研究擬於蝴蝶蘭栽培場內調查鐮胞菌病害發生的情形，以釐清上述由 *Fusarium* spp. 造成之蝴蝶蘭病害種類。

材料與方法

田間病害調查與病徵觀察

西元2008至2011年間不定期前往台灣各地蝴蝶蘭栽培場進行病害調查，包括宜蘭縣3處、彰化縣1處、南投縣1處、嘉義縣20處、台南縣 (市) 27處及屏東縣3處等共55處。每處蝴蝶蘭栽培場調查10個不同品種，每個品種調查200盆植株，檢視植株是否出現葉片黃化、落葉、葉鞘基部黑腐及葉片或葉鞘出現黑色或灰色病斑等病徵，並計算發病率。調查時，若植株已出現上述病徵，即視為發病，並計算發病百分率 (disease incidence, %)，發病率 (%) = (發病株數/調查總株數) x100。田間病害調查時，採回罹病植株於實驗室進行可疑病原菌分離與鑑定。

病原菌的分離與鑑定

由田間採回上述各式病徵之罹病株，首先以消毒過之解剖刀切取1 cm^2 的各種不同病徵之罹病組織片段，該組織片段經以1：4= 5.25% 次氯酸鈉 (sodium hypochloride)：無菌水之消毒液表面消毒10 sec 後，以無菌水漂洗一次，再用清潔之衛生紙吸乾組織片段表面的無菌水，最後將其置於2% (w/v) 的水瓊脂培養基 (2% water agar, WA) 平板上。隨後將培養基置於室溫下2-3天，待有菌絲自組織片段周圍長出時，觀察菌落形態，並於顯微鏡 (CH40RF100, Olympus, Japan) 下初步鏡檢孢子形態，計算同一菌落形態分離株的分離率。微生物菌株分離率 (%) = (所分離得到同一形態菌落個數/總分離個數) x 100。之後，切取WA培養基上分離株菌絲尖端，培養於馬鈴薯葡萄糖瓊脂 (potato dextrose agar, PDA, Difco) 斜面試管中，於室溫下 (26-28℃) 培養。進行形態學觀察時，以移殖環沾取PDA斜面試管中分離株部分分生孢子，於 2% WA平板培養基上畫線培養，經12 h 後，將該分離株單孢培養於PDA平板上7-10天觀察菌落形態。另單孢培養於2% WA上3-5天，以光學顯微鏡鏡檢、觀察分離菌株的孢子形態、大小及分生孢子梗構造，再參考Summerell等人[18]與Leslie與Summerell[12]所描述的鐮胞菌孢子著生方式與形態，鑑定所分離之鐮胞菌菌株。

接種方法與病原性測定

<u>接種法：</u>利用移殖針切取供試菌株的菌絲尖端，移置於新鮮之PDA平板培養基中，於室溫 (26-28℃) 下培養兩星期。之後，以直徑8-mm打孔器切取供試菌絲塊，即為菌絲塊接種法 (mycelial agar disc inoculation) 之接種源。又將供試菌株單孢培養於PDA斜面試管培養基中，於室溫下培養兩星期。之後，各菌株之培養基試管中分別加入 9 ml 的無菌水，利用移殖環輕刮斜面培養基表面，所得之孢子懸浮液經兩層紗布過濾後，震盪混合均勻，於光學顯微鏡下，利用血球計數器 (Hemocytometer, Marienfeld,

Germany) 計算單位體積的孢子數，並換算爲孢子懸浮液的濃度，再利用無菌水調整孢子懸浮液濃度至1-4x10^5 spores/ml，即爲孢子懸浮液接種法 (spore suspension inoculation) 之接種源。取供試植株 (1.5吋盆苗，購自彰化縣台大蘭園的蝴蝶蘭A2225品種 (*Doritis pulcherrima* x *Phalaenopsis meteor*)，於葉鞘或葉片部位，利用大頭針製造7個人工傷口。利用移殖針將供試的菌絲塊移置或利用吸管將 0.2 ml 的孢子懸緩緩滴於供試植株的人工傷口上，再以透氣膠帶 (Nexcare, 3M micropore) 黏貼於接種部位上方，即完成接種手續，並以 8-mm 空白 PDA 瓊脂塊 (pathogen-free PDA agar disc) 與無菌水爲對照組，每個菌株接種8株供試植株。

<u>病勢進展之記錄</u>：將完成接種手續的植株置於同一塑膠盒 (26×21×8 cm^3) 內，再套上一透明塑膠袋 (62 x 50 cm^2)，於試驗期間皆密封保濕，放置於溫室 (9-11月溫度22-28℃、相對濕度60-100%) 中觀察植株的發病情形。接種後第5天，移除透氣膠帶，每星期記錄罹病度 (disease severity) 1次，連續4次。罹病度等級分爲四級 (0-3)：0級表示植株健康無病徵；1級表示接種部位出現黑褐色壞疽癒合斑；2級表示植株出現葉片黃化；3級表示落葉。

<u>病原性測定</u>：由田間不同病徵之罹病株罹病部位分離得到之病原微生物分離株，挑選其中之黃葉病菌株FST1、TJP-1043-2、TJP-1057-13，黑斑病菌株F0217-23、F0217-24、F925L7，以及灰斑病菌株N8282、N8284等8株分離株，於溫室中以上述菌絲塊接種法與孢子懸浮液接種法，將菌株接種於蝴蝶蘭A2225品種1.5吋盆苗的植株葉鞘與葉片部位，每供試菌株接種8株供試植株。接種之後，供試植株置於溫室，每天觀察供試植株的病勢進展情形，並依上述方法記錄罹病度。

供試菌株的分子鑑定

根據病原性測定結果，選取具病原性之 FST1、N8284 及 F0217-23 菌株，單孢培養於 PDA 培養基平板上 7 天，隨即送往明欣生物科技有限公司 (MB mission biotech, Taichung, Taiwan) 進行 DNA 萃取 (參考 Qiagen DNeasy Plant Kit 進行) 與 PCR 增幅與定序 (以 ITS5&ITS4 與 ITS1&ITS4 當引子)，定序後之序列再於 NCBI (National Center for Biotechnology Information) 網站上所登錄之資料庫進行菌株序列分析比對，並將該序列登錄於 NCBI 基因資料庫。

溫度對 Fusarium 屬病原菌菌絲生長的影響

將 FST1、N8284 及 F0217-23 等 Fusarium 屬病原真菌菌株，以移殖環沾取部分分生孢子，並於 2% WA 培養基平板上畫線培養，經 12 h 後，挑取單孢並培養於 PDA 培養基平板上 3-5 天，以 8-mm 打孔器切取菌落周圍菌絲，將菌絲塊置於新配置之 PDA 培養基平板之中央。隨即將 PDA 培養基平板分別放置於 8、12、16、20、24、28、32 及 36℃ 定溫箱中，每個處理溫度放置 5 個培養皿，每天觀察菌絲生長的情形，量取菌落直徑，並換算菌絲生長速率 (mm/day)。

病原菌混合接種

<u>**黃葉病菌(*Fusarium solani*)與黑斑病菌(*F. proliferatum*)混合接種**</u>：將*F. solani*供試菌株FST1與*F. proliferatum*供試菌株F0217-23、F925L7等以孢子懸浮液接種法，分別接種於1.5吋盆苗蝴蝶蘭A2225品種的植株葉鞘與葉片部位。試驗又依等體積混合，製備多種混合孢子懸浮液，包括FST1與F0217-23、FST1與F925L7、F0217-23與F925L7，以及FST1、F0217-23及F925L7等孢子懸浮混合液，依上述方法接種，每處理接種8株植株。試驗並以無菌水爲對照組，另一對照組則採菌絲塊接種法接種FST1菌株。

<u>**黃葉病菌與灰斑病菌(*Fusarium oxysporum*)混合接種**</u>：將*F. solani*供試菌株FST1與*F. oxysporum*供試菌株N8284及Fol-07 (分離自仙履蘭，其菌落形態與N8284相似) 等以孢子懸浮液接種法，分別接種於1.5吋盆苗的蝴蝶蘭A2225品種植株葉鞘與葉片部位。試驗又依等體積混合，製備多種混合孢子懸浮液，包括有FST1與N8284、FST1與Fol-07、N8284與Fol-07，以及FST1、N8284及Fol-07等孢子懸浮混合液。依上述方法接種，每處理接種8株植株。試驗並以無菌水爲對照組，另一對照組則採菌絲塊接種法接種FST1菌株。

<u>**黃葉病菌、黑斑病菌與灰斑病菌混合接種**</u>：將*Fusarium solani* 供試菌株 FST1、*F. proliferatum* 供試菌株F0217-23 及 *F. oxysporum* 供試菌株 N8284 等以孢子懸浮液接種法，接種於1.5吋盆苗的蝴蝶蘭A2225品種植株葉鞘與葉片部位。試驗依等體積混合，製備多種混合孢子懸浮液，包括有FST1與N8284、FST1與F0217-23、N8284與

F0217-23，以及FST1、N8284及F0217-23等孢子懸浮混合液。依上述方法接種於A2225供試植株的葉鞘與葉片部位，每處理接種8株植株。試驗並以無菌水為對照組，另一對照組則採菌絲塊接種法接種FST1菌株。

資料統計分析

接種後所得罹病度資料之差異顯著性測驗，係利用 IBM SPSS Statistics (version 19) 統計分析軟體進行變方分析 (analysis of variance, ANOVA) 及最小顯著差異性 (least significant difference, LSD, p= 0.05) 測驗，另溫度對菌株生長的影響結果則以複迴歸分析之 (multiple regression analysis)。

結 果

蝴蝶蘭黃葉病的田間病害調查與病原菌鑑定

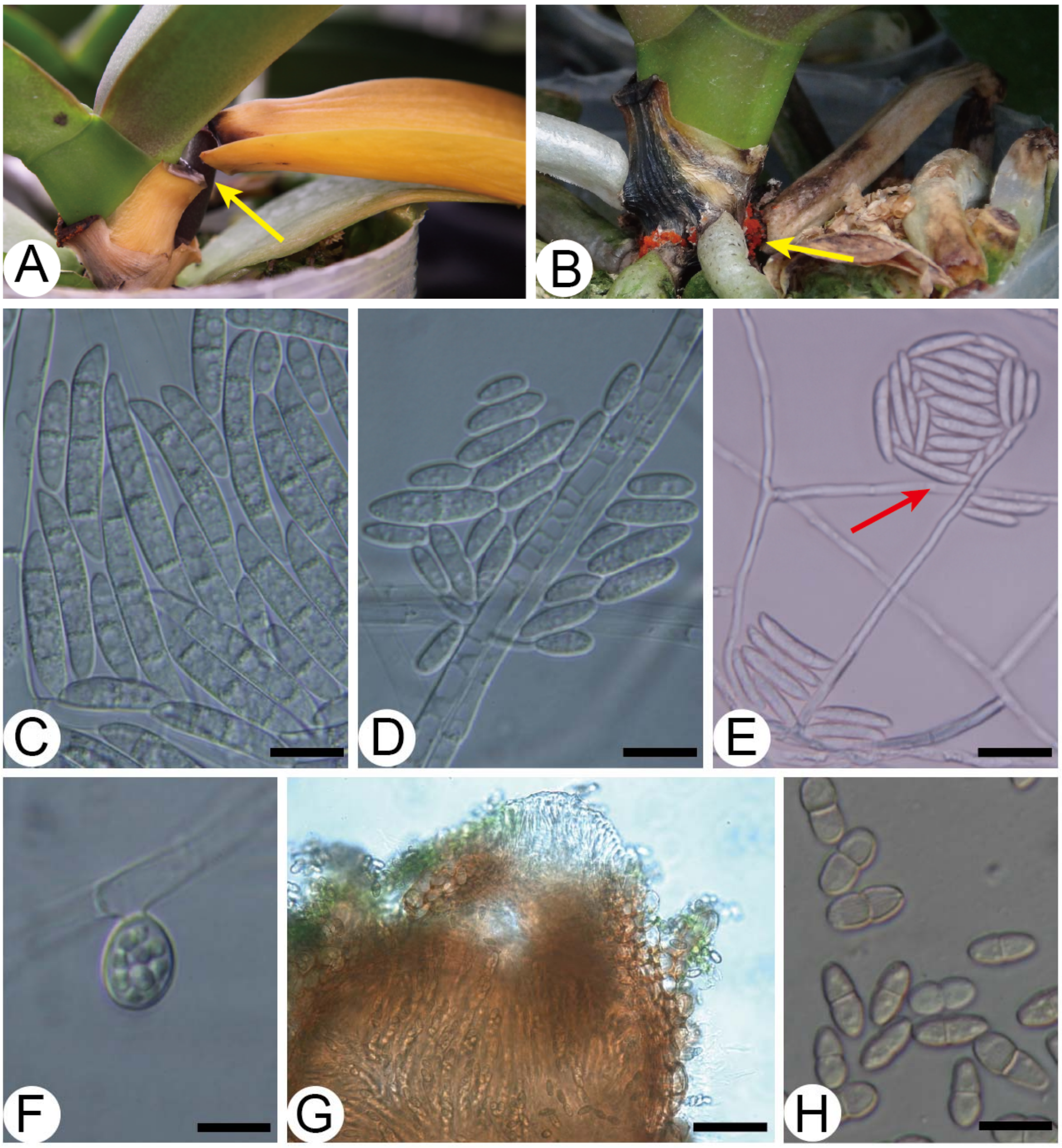
西元 2008 至 2011 年間不定期前往 55 處蝴蝶蘭園進行病害調查，結果 55 處蝴蝶蘭園內皆有植株發生葉片黃化、落葉 (圖一、A) 現象，葉鞘或靠近葉鞘的裸露根部出現黑腐病徵，農民俗稱「黑頭」。有時在罹病株的葉鞘與根部黑腐部位出現成堆的橙紅色子囊殼 (圖一、B)。在彰化、嘉義及台南等 3 處蝴蝶蘭園進行 27 個栽培品種的調查，結果病害的發病率介於 0-59%之間，其中位於台南新建造未滿三年的溫室，調查植株發病率僅介於 0-3% (表一)。在宜蘭 2 處蝴蝶蘭溫室調查 17 個栽培品種，結果病害的發病率介於 0-31% (表二)。

由田間採回 10 株「黑頭」罹病株，由每棵罹病株切取 4-8 個 1 cm^2 的罹病葉鞘組織片段，於實驗室進行病原菌分離，結果在 WA 平板培養基上罹病組織部位可分離得到初步鑑定為 Fusarium 屬的真菌分離株，而該同一菌落形態的 *Fusarium* sp.分離率為 85%。再以光學顯微鏡進行形態學觀察，分離菌株的大孢子為鐮胞狀，3-4 胞，具有足細胞與頂細胞，大孢子長度介於 33.4- 46.8 μm，平均 39.9 μm (圖一、C)。小孢子為橢圓形至短桿狀，1-2 胞，小孢子長度介於 8.5- 18.8 μm，平均 13.4 μm (圖一、D)。分生孢子呈假頭狀著生於分生孢子梗上，而分生孢子梗長度通常會大於大孢子長度的 5-6 倍 (圖一、E)。厚膜孢子圓形，可單生於菌絲尖端，厚膜孢子直徑介於 4.9- 10.1 μm，平均 7.8 μm (圖一、F)。而將分離株純化培養於 PDA 培養基上一個月後，可於培養基上觀察到橙紅色的子囊殼產生，子囊殼直徑介於 193.6- 344.7 μm，平均 272.1 μm。挑取子囊殼以徒手切片橫切剖面後，於顯微鏡下觀察，子囊殼內有子囊著生，子囊長度介於 57.1- 69.9 μm，平均 63.1 μm (圖一、G)。每個子囊內有八個子囊孢子，子囊孢子為橄欖球形、雙胞，子囊孢子長度介於 8.9- 12.9 μm，平均 10.6 μm (圖一、H)。根據以上病原菌孢子形態的觀察，再參考 Summerell 等人[18]與 Leslie 與 Summerell[12]所描述的鐮胞菌孢子著生方式與形態，鑑定所分離的菌株為 *Fusarium solani*，有性世代為 *Haematonectria haematococca*。挑選其中 FST1、TJP-1043-2 及 TJP-1057-13 等分離株，在溫室以菌絲塊與孢子懸浮液接種於供試植株的葉鞘與葉片人工傷口部位。結果接種株可產生與田間相同的病徵，包括於接種部位出現黑腐、黃化、落葉，並有成堆的橙紅色子囊殼產生，由罹病部位又可重新分離得到 *F. solani* 分離株。本研究將本病害稱之為蝴蝶蘭黃葉病 (yellow leaf of *Phalaenopsis*)，Su 等人英名又稱為 sheath and root rot of *Phalaenopsis* [17]。

蝴蝶蘭灰斑病的田間病害調查與病原菌鑑定

在所調查的 55 處蝴蝶蘭園中，僅在宜蘭 3 處、雲林 1 處及嘉義 1 處等 5 處蝴蝶蘭園中發現罹病株葉片與葉鞘出現不規則至圓形黑褐色病斑，病斑周圍有黃暈，病斑中間則出現灰白色病徵 (圖二、A)。發病嚴重時，病斑癒合成不規則形 (圖二、B)。若病斑出現於葉基部或葉鞘，則容易使植株產生葉片黃化的病徵 (圖二、C)。在宜蘭 2 處蝴蝶蘭溫室中調查 17 個栽培品種之結果，本病的發病率介於 0-7% (表二)。

由田間採回上述病徵之 10 株罹病株，由每棵罹病株切取 4-8 個 1 cm^2 的罹病組織片段，於實驗室進行病原菌分離，結果在 WA 平板培養基上的罹病組織可分離得到初步鑑定為 Fusarium 屬的真菌分離株，而該同一菌落形態的 *Fusarium* sp.分離率為 94%。再以光學顯微鏡進行形態學觀察，所分離的菌株具有大孢子與小孢子 (圖二、D)，大孢子為鐮胞狀，3-5 胞，具足細胞與頂細胞，大孢子長度介於 27.8- 37.7 μm，平均 33.8 μm。小孢子為腎形至短桿狀，1-2 胞，小孢子長度介於 4.2- 9.9 μm，平均 6.7 μm。



圖一、蝴蝶蘭黃葉病的病徵與病原菌形態。(A) 罹病植株出現葉鞘、葉片黃化，繼之落葉 (黃色箭頭)；(B) 罹病葉鞘、根部出現黑腐，繼之有橙紅色子囊殼產生 (黃色箭頭)；(C) 大孢子 (bar= 10 μm)；(D) 小孢子 (bar= 10 μm)；(E) 分生孢子以假頭狀著生於分生孢子梗 (紅色箭頭) (bar= 40 μm) ； (F) 厚膜孢子 (bar= 10 μm)；(G) 橙紅色子囊殼爲本病原菌的有性世代 (*Haematonectria haematococca*)，子囊殼內著生有子囊與子囊孢子 (bar= 50 μm)；(H) 子囊孢子 (bar= 10 μm)。

Fig. 1. The symptom of yellow leaf of *Phalaenopsis* and the morphology of causal agent, *Fusarium solani*. (A) Diseased plant showed yellowing sheath and leaf and then resulting defoliation (yellow arrow); (B) Symptom of black rot appeared on sheath and root and then followed by orange-red perithecia production (yellow arrow); (C) Macroconidia (bar= 10 μm); (D) Microconidia (bar= 10 μm); (E) False head of conidia born on conidiophore (red arrow) (bar= 40 μm); (F) Chlamydospores (bar= 10 μm); (G) Orange-red perithecia (pathogen teleomorph, *Haematonectria haematococca*) contained asci and ascospores (bar= 50 μm); (H) Ascospores (bar= 10 μm).

表一、蝴蝶蘭黃葉病的田間病害調查

Table 1. The disease surveys of yellow leaf of *Phalaenopsis* in the fields

Location[1]	Code number of cultivar	Pot size (in.)	Date of transplanting	Days after transplanting	Disease incidence (%)[2]
Changhua	A4032	2.5	7 Aug., 2010	124	4
	A6140	1.5	7 Sep., 2010	93	4
	A6255	1.5	3 Nov., 2010	36	0
	A6922	1.5	20 Oct., 2010	50	8
	A7175	2.5	26 Nov., 2010	13	2
	A7176	2.5	26 Nov., 2010	13	3
	A7220	2.5	1 Nov., 2010	38	4
	A7996	2.5	2 Dec., 2010	7	8
	A8107	1.5	7 Sep., 2010	93	9
	A8784	2.5	3 Dec., 2010	6	14
Chiayi	A1366	2.5	29 Jul., 2010	61	0
	A4268	3.5	3 Sep., 2010	27	13
	A4285	2.5	7 Jun., 2010	114	23
	A4285	3.5	7 Oct., 2009	357	28
	A5001	3.5	20 Jun., 2010	102	0
	A7175	2.5	27 Jul., 2010	63	5
	A7115	2.5	29 Jul., 2010	61	43
	A6369	3.5	5 Oct., 2010	359	59
Tainan	O1118	2.5	10 Jun., 2010	182	2
	O1146	2.5	8 Oct., 2010	62	3
	O1233	2.5	6 Oct., 2010	64	1
	O1245	2.5	20 Nov., 2010	19	1
	O1438	2.5	20 Oct., 2010	50	0
	O1340	2.5	7 Jul., 2010	155	0
	O1369	2.5	21 Sep., 2010	79	0
	O1420	2.5	2 Jul., 2010	160	0
	O1425	3.5	31 Oct., 2010	39	0

[1]Disease incidences were surveyed on 30 September, 9 December and 9 December, 2010 in *Phalaenopsis* cultivation greenhouses located in Changhua, Chiayi and Tainan, respectively.

[2]Two thousand plants of each cultivar were investigated.

分離菌株的分生孢子可以假頭狀著生於分生孢子梗上，而分生孢子梗長度通常較短 (圖二、E)。厚膜孢子圓形，可成單或雙個間生於菌絲上 (圖二、F)。將分離株純化培養於 PDA 培養基上一個月後，於培養基上產生紫黑色至黑色的菌核，菌核直徑介於 259.1- 449.9 μm，平均 358.9 μm。根據以上病原菌孢子形態的觀察，再參考 Summerell 等人(18)與 Leslie 與 Summerell(12)所描述的鐮胞菌孢子著生方式與形態，鑑定所分離菌株為 *F. oxysporum*。挑選其中 N8282 與 N8284 分離株，在溫室中以菌絲塊與孢子懸浮液接種於供試植株的葉鞘與葉片部

表二、宜蘭地區之蝴蝶蘭 Fusarium 病害調查

Table 2. Field survey of *Phalaenopsis* Fusarium diseases in Yilan county

Green-house[1]	Code number of cultivar	Pot size (in.)	Disease incidence (%)[2]		
			Yellow leaf	Gray spot	Black spot
A	KC2902	3.5	13	6	27
	KC3470	3.5	12	1	2
	KC4919	3.5	31	7	13
	KC70155	3.5	13	3	14
	KC80052	3.5	2	1	10
	KC80075	3.5	7	4	14
	KC9501	3.5	3	1	7
B	KC2927	3.5	2	0	0
	KC32	3.5	5	2	0
	KC3470-2	3.5	19	0	1
	KC3993	3.5	8	0	0
	KC4909	3.5	4	0	24
	KC4921	3.5	1	1	0
	KC70167	1.5	0	0	0
	KC80040	3.5	2	0	0
	KC80077	2.5	2	0	0
	KC80282	3.5	2	0	9

[1]Field survey was conducted on 14 January, 2011.

[2]Two thousand plants of each cultivar of *Phalaenopsis* were investigated for disease incidence.

位。結果接種株可產生與田間相同的病徵，包括於接種部位出現圓形黑褐色病斑，病斑周圍有黃暈，病斑中間出現灰白色病徵，由罹病部位又可重新分離得到 *F. oxysporum* 分離株。接種時，在高濕度的環境下病斑周圍的黃暈會擴大，甚至造成葉片黃化。本研究將本病害稱為蝴蝶蘭灰斑病，英名為 gray spot of *Phalaenopsis*。

蝴蝶蘭黑斑病的田間病害調查與病原菌鑑定

在所調查的 55 處蝴蝶蘭園中，僅於宜蘭 3 處與彰化 1 處蝴蝶蘭園中發現罹病株的葉鞘 (圖三、A) 與葉片 (圖三、B) 出現圓形至不規則形的黑色病斑。而有些品種的葉鞘罹病後，葉片有偏黃的現象 (圖三、C)。在宜蘭 2 處蝴蝶蘭溫室調查 17 個栽培品種之結果，發病率介於 0-27% (表二)。

由田間採回上述病徵之 10 株罹病株，由每棵罹病株切取 4-8 個 1 cm^2 的罹病組織片段，於實驗室進行病原菌分離，結果在 WA 平板培養基上的罹病部位可分離得到初步鑑定為 Fusarium 屬的真菌分離株，而該同一菌落形態的 *Fusarium* sp.分離率為 75%。於光學顯微鏡下進行形態學觀察，分離菌株培養於 PDA 斜面培養基上，大孢子呈鐮刀狀，4-6 胞，足細胞與頂細胞不明顯 (圖三、D)，大孢子長度介於 32.4- 59.8 μm，平均 51.6 μm。然而，培養於 WA 培養基上甚少有大孢子產生，卻容易有小孢子產生，小孢子呈鏈狀排列 (圖三、E)，小孢子長度介於 4.4- 8.7 μm，平均 6.5 μm，而分生孢子梗可為單瓶狀枝或複瓶狀枝(圖三、F)。本病原菌不論培養在 WA 或 PDA 培養基上，皆不產生厚膜孢子。根據以上病原菌孢子形態的觀察，再參考 Summerell 等人[18]與 Leslie 與 Summerell[12]所描述的鐮胞菌孢子著生方式與形態，鑑定所分離之菌株為 *F. proliferatum*。挑選其中 F0217-23、F0217-24 及 F925L7 等菌株，在溫室以菌絲塊與孢子懸浮液接種於蝴蝶蘭植株的葉鞘與葉片部位。結果植株可出現與田間相同的病徵，於

接種部位出現圓形至不規則形的黑色病斑，由罹病部位又可重新分離得到 *F. proliferatum* 分離株。本研究將本病害稱爲蝴蝶蘭黑斑病，英名爲 black spot of *Phalaenopsis*。

引起各型蝴蝶蘭病害之 Fusarium 菌株的分子鑑定

利用分子生物技術鑑定供試菌株 FST1、F0217-23 及 N8284，結果 FST1 菌株之 ITS 序列與 NCBI 資料庫之 *Fusarium solani* HM064429.1 (GenBank accession number) 達 100% 之相似度，佐證 FST1 爲 *F. solani*。將 FST1 的序列登錄於 NCBI 基因資料庫，其在 NCBI GenBank accession numbers 爲 JX486822。F0217-23 菌株之 ITS 序列與 NCBI 資料庫之 *F. proliferatum* GV594758.1 (GenBank accession number) 達 100% 之相似度，佐證 F0217-23 爲 *F. proliferatum*。將 F0217-23 的序列登錄於 NCBI 基因資料庫， NCBI GenBank accession numbers 爲 JX486821。N8284 菌株之 ITS 序列與 NCBI 資料庫之 *F. oxysporum* HQ651161.1 (GenBank accession number) 達 100% 之相似度，佐證 N8284 爲 *F. oxysporum*。將 N8284 的序列登錄於 NCBI 基因資料庫，NCBI GenBank accession numbers 爲 JX486823。

溫度對 Fusarium 病原菌菌絲生長的影響

將供試菌株 FST1、F0217-23 及 N8284 培養於 PDA 培養基平板，並放置於 8、12、16、20、24、28、32 及 36 ℃定溫箱中。7 天後調查之結果顯示 FST1 菌株之菌絲最適生長溫度爲 24-28 ℃，菌絲生長速度介於 4.8-5.3 mm/day；F0217-23 菌株之菌絲最適生長溫度爲 20-32 ℃，菌絲生長速度介於 2.1-3.1 mm/day；而 N8284 菌株之菌絲最適生長溫度爲 20-28 ℃，菌絲生長速度介於 3-3.3 mm/day。三株供試菌株之菌絲生長速度均隨著溫度的增加或減少成線性關係減少，於 8 ℃與 36 ℃下即無法生長 (圖四)。

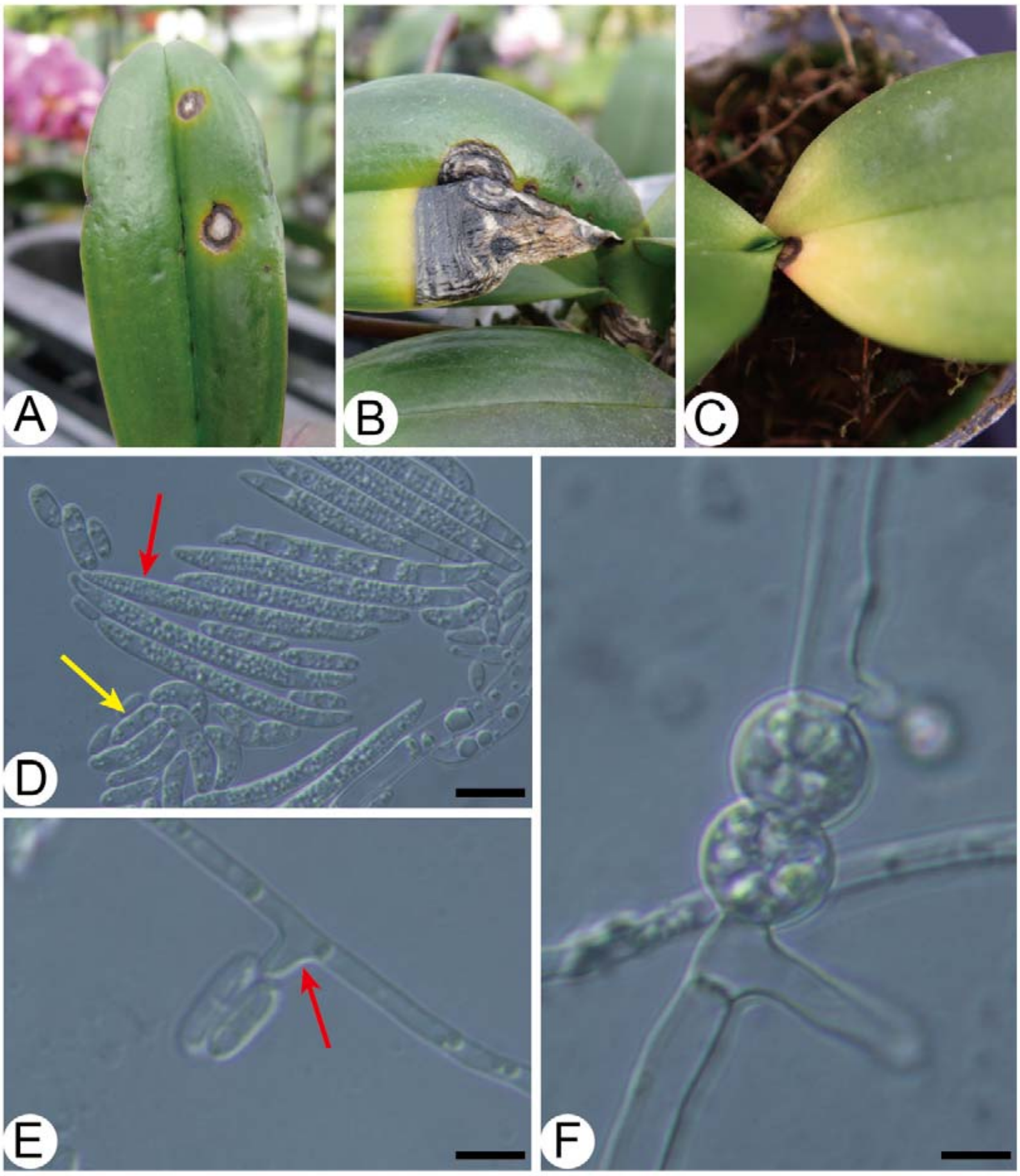
黃葉病菌與黑斑病菌混合接種

將供試菌株 FST1、F0217-23 及 F925L7 之個別或混合孢子懸浮液，接種於供試植株的葉鞘與葉片部位。結果以無菌水當對照組者，不論接種在葉鞘或葉片，均未出現病徵。以 FST1 菌絲塊當對照組者，不論接種在葉鞘或葉片，接種株於接種後第 10 天即出現葉片黃化的病徵，罹病度皆大於 1.9 (表三)。單獨以 FST1 孢子懸浮液接種於葉鞘與葉片部位者，接種後第 10 天於接種部位皆已出現黑褐化病徵，罹病度分別爲 1.0 與 1.5；在接種後第 21 天，即有部分植株出現葉片黃化的病徵，罹病度分別爲 1.9 與 1.6。單獨以 F0217-23 與 F925L7 孢子懸浮液接種於葉鞘與葉片部位者，接種後第 10 天於接種部位皆已出現黑褐化病徵，罹病度皆爲 1.0；但是接種後第 21 天之病徵未見擴大，罹病度維持爲 1.0 (表三)。改以孢子懸浮混合液接種，則 FST1 與 F0217-23 混合液與 FST1 與 F925L7 混合液，接種後第 10 天於接種部位皆已出現黑褐化病徵，罹病度皆大於 1.1；而接種後第 21 天，有部分接種株出現葉片黃化的病徵，罹病度皆大於 1.5。而以 F0217-23 與 F925L7 孢子懸浮混合液接種者，接種後第 10 天於接種部位出現黑褐化病徵，罹病度爲 1.0；然而於接種後第 21 天亦僅呈現黑褐化病徵，罹病度維持爲 1.0。再以 FST1、F0217-23 及 F925L7 孢子懸浮混合液接種於葉鞘與葉片，接種後第 10 天於接種部位出現黑褐化病徵，罹病度分別爲 1.1 與 1.5。而接種株病勢持續發展，在接種後第 21 天，即有部分接種株出現葉片黃化的病徵，罹病度分別爲 1.9 與 1.9 (表三)。

黃葉病菌與灰斑病菌混合接種

將供試菌株 FST1、N8284 及 Fol-07 之個別或混合孢子懸浮液接種於供試植株的葉鞘與葉片部位。結果以無菌水當對照組，接種後於傷口部位有輕微黑腐病徵產生，但是罹病度皆小於 0.7，由發病部位可分離得到黃葉病菌。而以 FST1 菌絲塊接種當對照組者，或是以 FST1 孢子懸浮液當接種源，不論接種在葉鞘或葉片，於接種後第 14 天植株即出現葉片黃化的病徵，罹病度皆大於 1.8 (表四)。單獨以 N8284 孢子懸浮液接種於葉鞘部位，第 14 天後植株出現葉片黃化，罹病度大於 2.1；但是接種於葉片者，接種後第 14 天，僅於接種部位產生黑腐病徵，罹病度爲 1.4，而在接種後第 21 天，始產生黃葉的病徵，罹病度爲 2.3。單獨以 Fol-07 孢子懸浮液接種於葉鞘與葉片部位者，第 14 天僅有部分植株於接種部位出現黑褐色病徵，罹病度小於 1.0；而於接種後第 21 天，於接種部位亦僅表現黑褐色病徵，罹病度亦皆小於 1.8 (表四)。改以孢子懸浮混合液接種，則 FST1 與 N8284 混合液，不論接種在葉鞘或葉片，於第 14 天植株即出現葉片黃化的病徵，罹病度皆大於 1.8。以 FST1 與 Fol-07 混合液接種於葉鞘部位，第 14 天即出現葉片黃化的病徵，罹病度大於 2.0；然而以 FST1 與 Fol-07 混合液接種於葉片部位，植株僅呈現黑褐色病徵，接種後第 21 天罹病度皆小於 1.6。以 N8284 與 Fol-07

混合液接種於葉鞘與葉片部位，於第 21 天大部分植株僅於接種部位出現黑褐色病徵，且接種於葉鞘部位的部分植株出現黃葉病徵，罹病度皆小於 2.1。再以 FST1、N8284 及 Fol-07 孢子懸浮混合液接種於葉鞘與葉片，則大部分植株於第 14 天均出現葉片黃化病徵，罹病度皆大於 1.8 (表四)。



圖二、蝴蝶蘭灰斑病病徵與病原菌形態。(A) 罹病葉片出現圓形黑褐色病斑，病斑周圍有黃暈，病斑中間則出現灰白色病徵；(B) 發病嚴重時，病斑癒合成不規則形；(C) 病斑出現於葉基部或葉鞘時，使植株產生黃葉；(D) 大孢子 (紅色箭頭) 與小孢子 (黃色箭頭)；(E) 分生孢子以假頭狀著生於分生孢子梗 (紅色箭頭)；(F) 厚膜孢子間生於菌絲上。(bar= 10 μm)

Fig. 2. The symptom of gray spot of *Phalaenopsis* and morphology of causal agent, *Fusarium oxysporum*. (A) Round black and brown spots on leaf with yellowing halo and gray discoloration in lesion center; (B) Round spots joined together to form an irregularly shaped lesion; (C) Spot lesion appeared on the base of leaf or sheath resulting the infected leaf turn yellow; (D) Macroconidia (red arrow) and microconidia (yellow arrow); (E) False head of conidia born on conidiophore (red arrow); (F) Chlamydospores. (bar= 10 μm)

表三、蝴蝶蘭黃葉病菌與黑斑病菌混合接種對於蝴蝶蘭病勢進展的影響

Table 3. Effect of mixed inoculation of *Fusarium solani* and *F. proliferatum* on disease development on *Phalaenopsis* plants[1]

	Disease severity (0-3)[2]					
	Inoculated on sheath			Inoculated on leaf		
Isolates	10[3]	14	21	10	14	21
CK1 (water)	0.0 d[4]	0.0 e	0.0 d	0.0 e	0.0 d	0.0 d
CK2 (FST1 agar disc)	1.9 a	3.0 a	3.0 a	2.5 a	2.5 a	2.5 a
FST1	1.0 c	1.4 cd	1.9 b	1.5 b	1.5 bc	1.6 bc
F0217-23	1.0 c	1.0 d	1.0 c	1.0 cd	1.0 c	1.0 c
F925L7	1.0 c	1.0 d	1.0 c	1.0 cd	1.0 c	1.0 c
FST1 + F0217-23	1.5 b	2.0 b	2.3 b	1.5 b	1.6 b	2.0 ab
FST1 + F925L7	1.1 c	1.3 cd	2.0 b	1.3 bc	1.3 bc	1.5 bc
F0217-23 + F925L7	1.0 c	1.0 d	1.0 c	1.0 bc	1.0 c	1.0 c
FST1 + F0217-23 + F925L7	1.1 c	1.8 bc	1.9 b	1.5 b	1.9 b	1.9 bc

[1]The yellow leaf isolate of *Fusarium solani* FST1, and the black spot isolates of *F. proliferatum* F0217-23 and F925L7 isolated from *Phalaenopsis* were used as inocula. The spore suspension inoculation was submitted, and each isolate had 1-4 x 10^5 spores/ml.

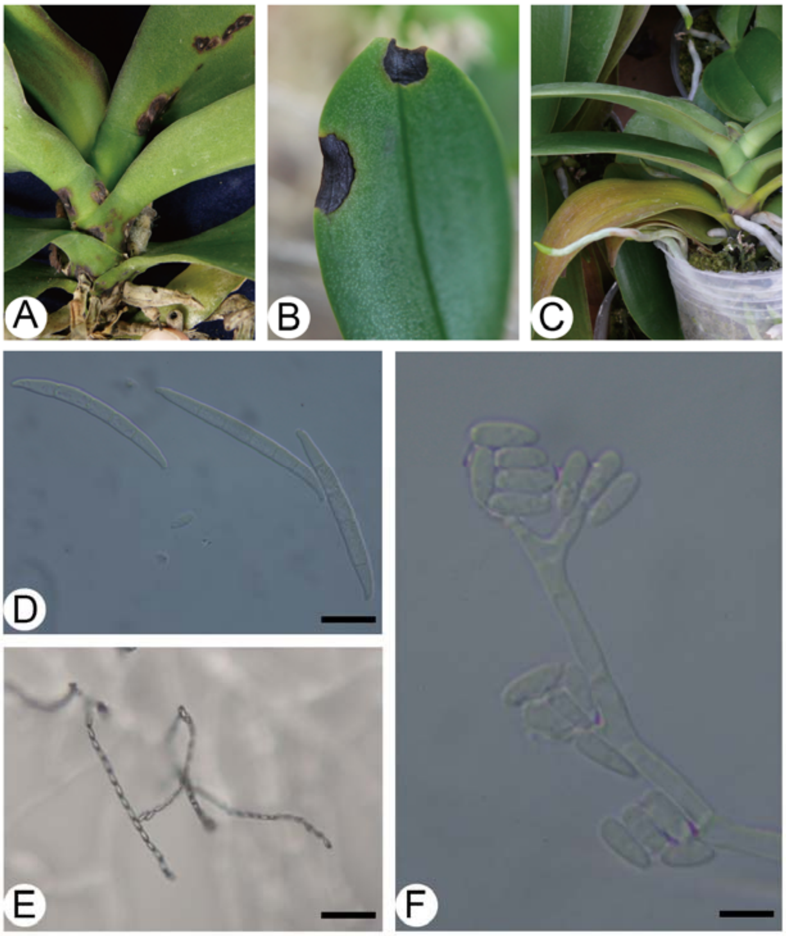
[2]The disease severities were assayed on a scale of 0-3: 0= healthy; 1= black rot on inoculated tissue; 2= yellowing leaf; 3= leaf defoliation.

[3]Days after inoculation. Eight plants of each treatment were assayed from 21 May to 11 June, 2010.

[4]Means within a column followed by the same letter are not significantly different at 5% level by LSD test.

黃葉病菌、黑斑病菌及灰斑病菌混合接種

將 FST1、F0217-23 及 N8284 菌株之個別或混合孢子懸浮液接種於供試植株的葉鞘與葉片部位。結果顯示以無菌水當對照組者，在葉片部位接種後第 28 天皆未發病，然而接種在葉鞘部位，於傷口部位產生輕微黑腐病徵，罹病度皆小於 1.0，由發病部位可分離得到黃葉病菌。以 FST1 菌絲塊接種當對照組者，或是以 FST1 孢子懸浮液當接種源，不論接種在葉鞘或葉片，植株於第 11 天即出現葉片黃化的病徵，罹病度皆大於 1.6 (表五)。單獨以 F0217-23 孢子懸浮液接種於葉鞘與葉片部位者，兩者於接種後第 28 天僅出現黑褐色病徵，罹病度小於 1.3。單獨以 N8284 孢子懸浮液接種於葉鞘或葉片部位，接種後第 11 天出現黑褐化具黃暈的病斑，罹病度小於 1.5；接種第 21 天後才會產生黃葉病徵，罹病度大於為 1.6 (表五)。改以孢子懸浮混合液進行接種，則以 FST1 與 F0217-23 和 FST1 與 N8284 混合液接種後，植株在第 11 天於接種部位皆已出現黑褐色病徵，部分植株亦已呈現黃葉病徵，罹病度皆大於 1.4；而在接種第 21 天以後植株皆呈現葉片黃化病徵，罹病度皆大於 2.1。而以 F0217-23 與 N8284 孢子懸浮混合液接種者，接種於葉鞘部位者，於接種後第 11 天皆出現黑褐色病徵，而第 21 天後亦僅有部分植株出現葉片黃化病徵，罹病度皆小於 1.6；然而接種於葉片部位者，植株於第 28 天調查時皆僅於接種部位產生黑褐色病徵，罹病度為 1.0。再以 FST1、F0217-23 及 N8284 孢子懸浮混合液接種，不論接種於葉鞘或葉片上，植株於接種後第 11 天即出現葉片黃化病徵，罹病度皆大於 1.6 (表五)。



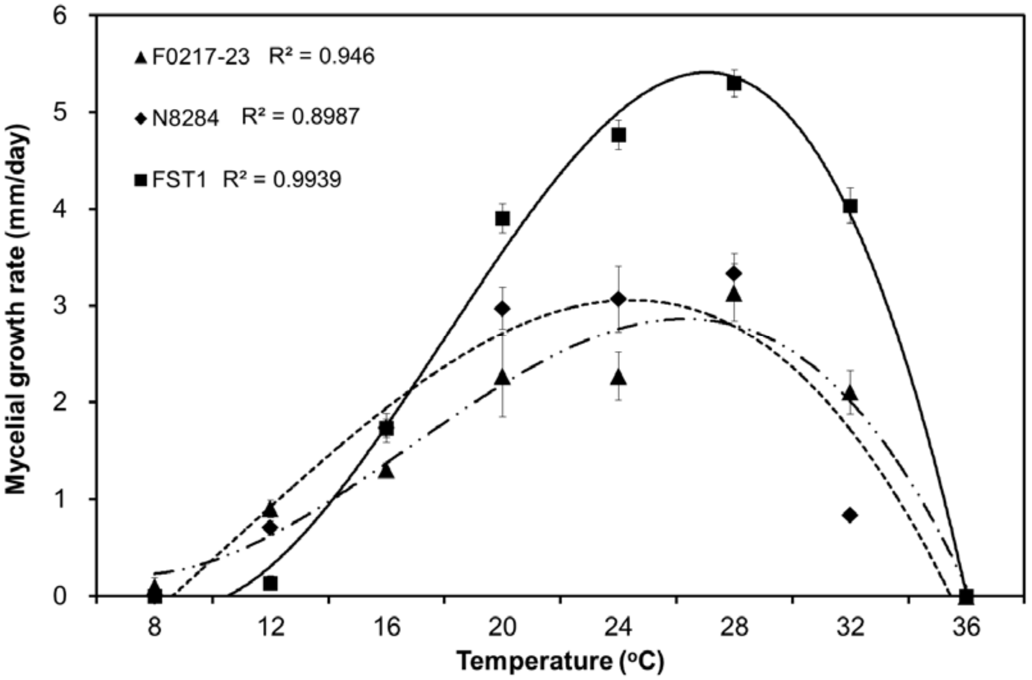
圖三、蝴蝶蘭黑斑病病徵與病原菌形態。罹病葉鞘(A)與葉片(B)出現圓形至不規則形黑色病斑；(C) 病斑出現於葉鞘，某些品種會因而產生黃葉；(D) 大孢子 (bar= 10 µm)；(E) 小孢子呈鏈狀排列 (bar= 20 µm)。(F) 複瓶狀枝之分生孢子梗 (bar= 10 µm)。

Fig. 3. The symptom of black spot of *Phalaenopsis* and morphology of causal agent, *Fusarium proliferatum*. The circular to irregular-shaped black spots appeared on sheath (A) and leaf (B); (C) In some cultivars, yellow leaves symptom appeared after sheath infection; (D) Macroconidia (bar= 10 µm); (E) Microconidia form in chains (bar= 20 µm); (F) Polyphialides (bar= 10 µm).

討 論

蝴蝶蘭產生葉片黃化的原因有許多種，主要可區分為非生物性與生物性因子。非生物性因子所造成的葉片黃化包括 1. 開花期的生理性黃葉[3]，2. 海運過程的葉片變黃[6]，3. 鉀肥缺乏時的下位葉黃化[19]，及 4. 磷肥缺乏時由葉尖開始黃化，逐步蔓延至整個葉片，最後導致落葉[22]。而生物性因子所造成的葉片黃化主要導因於蝴蝶蘭被多種鐮胞菌 (*Fusarium* spp.) 感染後所造成[4, 9, 10, 13]。而 Sato 等人[14]報導蝴蝶蘭被 *Nectria ochroleuca* 感染造成乾腐病 (sheath rot of *Phalaenopsis*)，主要病徵是葉鞘乾腐、葉片黃化、落葉與植株死亡。此外，亦有報導指出蝴蝶蘭被 *Odontoglossum ringspot virus* (ORSV)、*Cymbidium mosaic virus* (CymMV) 或 tospoviruses 感染時，蝴蝶蘭亦會出現葉片黃化的病徵[21]。

在台灣，Hsieh 等人[4]指出蝴蝶蘭受 *Fusarium solani* 與 *F. proliferatum* 感染會造成蝴蝶蘭黃葉病，罹病株地上部葉片會出現黃化、變薄或萎凋，有根腐病徵。在韓國 Kim 與 Chun[9]指出蝴蝶蘭的根、莖基腐敗病 (Root and basal stem rot of moth orchid) ，罹病株初期會出現萎凋、葉片出現黃化與紅化的病徵，接著罹病葉片會脫落，嚴重時導致死亡，經分離鑑定認為 *Fusarium solani*、*F. oxysporum* 及 *F. proliferatum* 皆可引起本病害。



圖四、溫度對各型蝴蝶蘭 Fusarium 病害之病原菌菌絲生長的影響。

Fig. 4. Effect of temperature on mycelial growth of various pathogens of Fusarium diseases of *Phalaenopsis*. F0217-23 isolate of *Fusarium proliferatum* caused black spot, N8284 isolate of *F. oxysporum* caused gray spot and FST1 isolate of *F. solani* caused yellow leaf were used as samples. Error bar= 95% confidence interval among temperatures.

表四、蝴蝶蘭黃葉病菌與灰斑病菌混合接種對於蝴蝶蘭病勢進展的影響

Table 4. Effect of mixed inoculation of *Fusarium solani* and *F. oxysporum* isolates on disease development on *Phalaenopsis* plants[1]

	Disease severity (0-3)[2]			
	Inoculated on sheath		Inoculated on leaf	
Isolates	14[3]	21	14	21
CK1 (water)	0.5 b[4]	0.3 c	0.1 d	0.7 d
CK2 (FST1 agar disc)	2.9 a	3.0 a	2.4 a	2.9 a
FST1	1.8 a	2.9 ab	2.1 ab	2.5 ab
N8284	2.1 a	3.0 a	1.4 abc	2.3 abc
Fol-07	0.5 b	1.8 b	1.0 c	1.3 cd
FST1 + N8284	1.9 a	2.6 ab	1.8 abc	2.9 a
FST1 + Fol-07	2.0 a	2.3 ab	1.5 abc	1.6 bcd
N8284 + Fol-07	1.8 a	2.1 ab	1.1 bc	1.3 cd
FST1 + N8284 + Fol-07	1.8 a	2.0 ab	1.8 abc	2.3abc

[1]The yellow leaf isolate of *Fusarium solani* FST1, and the gray spot isolates of *F. oxysporum* N8284 isolated from *Phalaenopsis* and the *F. oxysporum* Fol-07 isolate from *Paphiopedilum* were used as inocula. The spore suspension inoculation was submitted, and each isolate had 1-4 x 10^5 spores/ml.

[2]The disease severities were assayed on a scale of 0-3: 0= healthy; 1= black rot on inoculated tissue; 2= yellowing leaf; 3= leaf defoliation.

[3]Days after inoculation. Eight plants of each treatment were assayed from 6 to 27 August, 2010.

[4]Means within a column followed by the same letter are not significantly different at 5% level by LSD test.

表五、蝴蝶蘭黃葉病菌、黑斑病菌及灰斑病菌混合接種對於蝴蝶蘭病勢進展的影響

Table 5. Effect of mixed inoculation of *Fusarium solani*, *F. proliferatum* and *F. oxysporum* isolates on disease development on *Phalaenopsis* plants[1]

	Disease severity (0-3)[2]					
	Inoculated at sheath			Inoculated at leaf		
Isolates	11[3]	21	28	11	21	28
CK1 (water)	0.6 b[4]	0.8 b	1.0 c	0.0 c	0.0 c	0.0 c
CK2 (FST1 agar disc)	3.0 a	3.0 a	3.0 a	2.0 a	2.4 a	3.0 a
FST1	2.4 a	2.6 a	2.9 a	1.6 ab	2.0 ab	2.0 ab
F0217-23	1.0 b	1.0 b	1.3 bc	1.0 b	1.1 b	1.1 b
N8284	1.4 b	2.6 a	2.6 a	1.5 ab	1.6 ab	2.4 a
FST1 + F0217-23	2.3 a	2.8 a	2.8 a	1.4 ab	2.1 ab	2.1 ab
FST1 + N8284	1.4 b	2.5 a	3.0 a	2.1 a	2.1 ab	2.1 ab
F0217-23 + N8284	1.4 b	1.5 b	1.6 b	1.0 b	1.0 b	1.0 b
FST1 + F0217-23 + N8284	2.4 a	3.0 a	3.0 a	1.6 ab	2.1 ab	2.1ab

[1]The yellow leaf isolate of *Fusarium solani* FST1, the black spot isolate of *F. proliferatum* F0217-23 and the gray spot isolate of *F. oxysporum* N8284 isolated from *Phalaenopsis* were used as inocula. The spore suspension inoculation was submitted, and each isolate had 1-4 x 10^5 spores/ml.

[2]The disease severities were assayed on a scale of 0-3: 0= healthy; 1= black rot on inoculated tissue; 2= yellowing leaf; 3= leaf defoliation.

[3]Days after inoculation. Eight plants of each treatment were assayed from 19 August to 17 September, 2010.

[4]Means within a column followed by the same letter are not significantly different at 5% level by LSD test.

而 Kim 等人[(10)]指出蝴蝶蘭罹患根腐病 (Root rot of moth orchid) 時，罹病根部產生深褐色到黑色的根腐，下位葉則出現黃化的病徵，在某些蘭園發病率可達 30%，經分離與鑑定的結果顯示病原菌包括 *F. solani*、*F. oxysporum* 及 *F. proliferatum*，其中 *F. solani* 爲主要病原菌。在日本，雖然 Morita 等人[(13)]指出蝴蝶蘭受 *Nectria haematococca* (*F. solani* 的有性世代) 感染時，會造成 nectria blight of *Phalaenopsis* (該病害無中名)，但是其主要病徵爲根腐與植株萎凋死亡。由 Hsieh 等人[(4)]、Kim 與 Chun[(9)] 及 Kim 等人[(10)]等人的報導皆認爲多種 *Fusarium* spp.可在蝴蝶蘭引起同一類型病害。但是本研究先前試驗[(17)]卻認爲鐮胞菌 *F. solani*、*F. oxysporum* 及 *F. proliferatum* 可在蝴蝶蘭上造成不同的病害。爲證實此論點，本研究於田間蝴蝶蘭園進行病害調查 (表一、二)、實驗室病原菌鑑定與接種後，確認病原菌 *F. solani* (有性世代爲 *Haematonectria haematococca*) 會造成蝴蝶蘭黃葉病 (圖一)，病原菌 *F. oxysporum* 造成蝴蝶蘭灰斑病 (圖二)，而病原菌 *F. proliferatum* 造成蝴蝶蘭黑斑病 (圖三)。進一步將黑斑病菌 (F0217-23、F925L7) 菌株單獨接種，接種株並不會出現葉片黃化的病徵，若將黃葉病菌 (FST1) 與 F0217-23、F925L7 混合後接種，植株才會出現葉片黃化的病徵 (表三)。而 FST1 與灰斑病菌 (N8284) 不論單獨或混合接種，皆會造成植株葉片黃化 (表四)。另外，將 FST1 與 F0217-23 或 N8284 混合後接種，植株亦會出現葉片黃化的病徵，但是 F0217-23 與 N8284 混合接種者，植株卻不會出現葉片黃化的病徵 (表五)。再比對三個供試菌株的菌絲生長速度發現，24-28 ℃時 FST1 菌絲生長最快，而 F0217-23 與 N8284 的菌絲生長速度相當 (圖四)。可知當黃葉病菌 (FST1)、黑斑病菌 (F0217-23) 及灰斑病菌 (N8284) 處於同一個感染點，彼此之間屬於競爭的狀態，

亦即此三種病原微生物不易協同造成同一個病害。

將分離自仙履蘭莖腐病的 *Fusarium oxysporum* 供試菌株 Fol-07 (資料尚未發表) 單獨接種時，並不會引起蝴蝶蘭植株黃葉病徵；而同樣爲 *F. oxysporum* 的供試菌株 N8284 單獨接種時，卻會造成黃葉的病徵 (表四)。雖然 *F. oxysporum* 菌株間因對不同作物致病力的差異，而有寄主專一性 (formae speciales) 或是生理小種 (race) 的分化[2]，但是目前尚無法確定蝴蝶蘭灰斑病是否具有寄主專一性。同樣的，*F. solani* 菌株間亦存在寄主專一性的分化[1, 11]，而在蝴蝶蘭上，Chung 等人[1]將該病原菌命名爲 *F. solani* f. sp. *phalaenopsis*，但其所選用的 *F. solani* 供試菌株來源僅包括蝴蝶蘭 (*Phalaenopsis* spp.)、豌豆 (*Pisum sativum*)、長春花 (*Catharanthus roseus*)、菊花 (*Chrysanthemum indicum*) 及甜瓜 (*Cucumis melo*) 等。另外，Chung 等人[1]將源自蝴蝶蘭的 *F. solani* 菌株接種於蝴蝶蘭、文心蘭、石斛蘭、嘉德麗雅蘭及蕙蘭等植株上，於接種部位雖可引起些許的褐化病徵，但僅在蝴蝶蘭植株上產生黃葉的病徵。而 Huang 等人[7]報導將源自蝴蝶蘭、小花蕙蘭、文心蘭與仙履蘭的 *F. solani* 供試菌株，進行寄主間交互接種，結果源自不同蘭科作物的 *F. solani* 供試菌株，皆可交互感染供試的蘭科作物；另外，亦將源自龍膽 (*Gentiana* sp.) 的 *F. solani* 分離株，接種於蝴蝶蘭植株，結果亦會產生與黃葉病相同的病徵[7]。Morita 等人[13]認爲會產生有性世代 *Netria haematococca* (Synonym *Haematonectria haematococca*) 的 *F. solani* 分離株，通常爲弱病原性菌株，在作物栽培模式改變的情況下，可能會嚴重危害作物。因此，會產生有性世代 *H. haematococca* 的 *F. solani* 分離株，其寄主範圍仍有待進一步釐清。

文獻報導 *F. proliferatum* 可與其他病原微生物一起危害作物，如與 *Bipolaris australiensis*、*Curvularia lunata* 及 *Alternaria tenuis* 可造成水稻穗腐病 (rice spikelet rot disease)[8]。但是在許多情況下，*F. proliferatum* 並非造成病害的主要病原菌，且常與其他病原微生物同時由罹病株的罹病部位被分離出來。Shahnazi 等人[15]指出，由黑胡椒 (*Piper nigrum*) 黃化病 (yellowing disease) 罹病株可經常地同時分離到 *F. proliferatum* 與 *F. solani*，但是經接種試驗證實僅 *F. solani* 才是黑胡椒黃化病的病原菌。本研究在病原菌分離的過程中，有些 *F. proliferatum* 菌株可由蝴蝶蘭黃葉病的罹病部位被分離得到，但經病原菌孢子懸浮液混合接種證實 (表三)，*F. proliferatum* 在蝴蝶蘭植株上可造成黑斑病，卻不是黃葉病的病原菌。而 Su 等人[16]選用多種由田間不同罹病作物分離得到的 *F. proliferatum* 菌株，包括蝴蝶蘭黑斑病菌、蕙蘭細斑病菌及孤挺花赤斑病菌，以及分離自嘉德麗雅蘭與文心蘭的分離株，接種於人工製造傷口的孤挺花植株上，結果所有供試菌株均可在孤挺花植株上造成赤斑病的病徵。此結果顯示由其他作物所分離得到的 *F. proliferatum* 分離株，在有傷口的情況下皆[illegible]起孤挺花赤斑病。由本研究的田間病害調查發現，蝴蝶蘭黑斑病的發生並不普遍，這可能與蝴蝶蘭葉片含有臘質層能減少葉片產生傷口有關。而蝴蝶蘭黃葉病發生後，植株所產生的傷口或許有助於 *F. proliferatum* 纏聚於植株罹病組織上。

綜合本研究的調查結果，可清楚區隔三種鐮胞菌爲害蝴蝶蘭所產生的病徵，有助於吾輩未來進行田間病害調查時的參考依據。

謝　辭

本研究承蒙行政院農業委員會農業試驗所計畫經費補助，計畫名稱：花卉研究團隊-蝴蝶蘭黃葉病與細菌性病害之生態與防治技術開發，計畫編號：100 農科-9.2.1-農-C1(3)，試驗期間復蒙簡蘭懿與黎貴枝小姐等協助相關研究工作，謹致謝忱。

引用文獻 (LITERATURE CITED)

1. Chung, W. C., Chen, L. W., Huang, J. H., Huang, H. C., and Chung, W. H. 2011. A new ‘forma specialis’ of *Fusarium solani* causing leaf yellowing of *Phalaenopsis*. Plant Pathol. 60: 244-252.
2. Correll, J. C. 1991. The relationship between formae speciales, races, and vegetative compatibility groups in *Fusarium oxysporum*. Phytopathology 81: 1061-1064.
3. Hou, J. Y., Setter, T. L., and Chang, Y. C. A. 2010. Effects of simulated dark shipping on photosynthetic status and post-shipping performance in *Phalaenopsis* Sogo Yukidian 'V3'. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 135: 183-190.
4. Hsieh, T. F., Huang, T. C., and Chang, C. A. 2005. *Phalaenopsis* diseases. Pages 241-252 *in*: Taiwan Agriculture Encyclopedia: Crop edition-3. Council of Agriculture, Executive Yuan, Taipei. (in Chinese)

5. Hsu, S. T., Chang, T. T., Chang, C. C., Tsai, J. L., and Tsay, T. T. 2002. List of Plant Diseases in Taiwan 4th ed. Taiwan Phytopathological Society, Taiwan. 386 pp. (in Chinese)
6. Huang, C. C., Yu, S. C., Tsai, C. Y., Huang, H. S., and Chang, G. P. 2011. Effect of fertilization after simulated export transportation on flower quality and leaf color of *Phalaenopsis* Sogo Yukidian 'V3'. J. Taiwan Soc. Hort. Sci. 57: 133-142. (in Chinese with English abstract)
7. Huang J. H., Chen, C. C, and Su, J. F. 2010. Study on the morphology, pathogenicity and molecular detection of *Fusarium solani* causing orchid leaf-yellowing disease. Plant Pathol. Bull. 19: 288. (in Chinese)
8. Huang, S. W., Wang, L., Liu, L. M., Liu, E. Y., Hou, E. Q., Xiao, D. F., and Fan, Z. L. 2012. Isolation, identification and biological characters of pathogens of rice spikelet rot disease. Chinese J. Rice Sci. 26: 341-350. (in Chinese with English abstract)
9. Kim, J. W., and Chun, S. C. 2007. Root and basal stem rot of moth orchid (*Phalaenopsis* spp.), pung-nan (*Neofinetia falcate*) and nadopung-nan (*Aerides japonicum*) caused by *Fusarium* spp. Res. Plant Dis. 13: 6-14.
10. Kim, W. G., Lee, B. D., Kim, W. S., and Cho, W. D. 2002. Root rot of moth orchid caused by *Fusarium* spp. Plant Pathol. J. 18: 225-227.
11. Lee, Y. M., Choi, Y. K., and Min, B. R. 2000. Molecular characterization of *Fusarium solani* and its formae speciales based on sequences analysis of the internal transcribed spacer (ITS) region of ribosomal DNA. Mycobiology 28: 82-88.
12. Leslie, J. F. and Summerell, B. A. 2006. The *Fusarium* Laboratory Manual. Blackwell Publishing, UK. 388 pp.
13. Morita, Y., Arie, T., Kawarabayashi, S., Suyama, K., Namba, S., Yamashita, S., and Tsuchizaki, T. 1992. A new disease of *Phalaenopsis* and *Doritaenopsis* caused by *Netria haematococca*. Ann. Phytopath. Soc. Jpn. 58: 452-455.
14. Sato, T., Kusunoki, M., and Koganezawa, H. 1995. Sheath rot of *Phalaenopsis* caused by *Nectria ochroleuca*. Ann. Phytopath. Soc. Jpn. 62: 267.
15. Shahnazi, S., Meon, S., Vadamalai, G., Ahmad, K., and Nejat, N. 2012. Morphological and molecular characterization of *Fusarium* spp. associated with yellowing disease of black pepper (*Piper nigrum* L.) in Malaysia. J. Gen. Plant Pathol. 78: 160-169.
16. Su, J. F., Chen, Y. H., Chien, L. Y., Huang, J. H., and Hsieh, T. F. 2011. First report of Amaryllis red spot disease caused by *Fusarium proliferatum* in Taiwan. Plant Pathol. Bull. 20: 14-25. (in Chinese with English abstract)
17. Su, J. F., Lee, Y. C., Chen, C. W., Hsieh, T. F. and Huang, J. H. 2010. Sheath and root rot of *Phalaenopsis* caused by *Fusarium solani*. Acta Hort. (ISHS) 878: 389-394.
18. Summerell, B. A., Leslie, J. F., Backhouse, D., Bryden, W. L., and Burgess, L. W. 2001. Fusarium: Paul E. Nelson Memorial Symposium. APS Press, Minnesota, USA. 392 pp.
19. Wang, Y. T. 2010. *Phalaenopsis* mineral nutrition. Acta Hort. 878: 321-333.
20. Wei, S., Shih, C. C., Chen, N. H., and Tung, S. J. 2010. Value chain dynamics in the Taiwan orchid industry. Acta Hort. (ISHS) 878: 437-442.
21. Yamane, K., Oyama, K., Iuchi, E., Ogawa, H., Suzuki, T., and Natsuaki, T. 2008. RT-PCR detection of *Odontoglossum ringspot virus*, *Cymbidium mosaic virus* and tospoviruses and association of infections with leaf-yellowing symptoms in *Phalaenopsis*. J. Phytopathol. 156: 268-273.
22. Yoneda, K., Usui, M., and Kubota, S. 1997. Effect of nutrient deficiency on growth and flowering of *Phalaenopsis*. J. Jpn. Soc. Hort. Sci. 66: 141-147.

ABSTRACT

Su, J. F.[1], Lee, Y. C.[1], Chen, C. W.[1], Huang, J. H.[1], and Hsieh, T. F.[2, 3]. 2012. Field surveys for Fusarium diseases of *Phalaenopsis* in Taiwan. Plant Pathol. Bull. 21: 115-130. ([1]Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Council of Agriculture, Wefeng, Taichung, Taiwan, R.O.C.; [2]Floriculture Research Center, Taiwan Agricultural Research Institute, Council of Agriculture, GuKeng, YunLin, Taiwan, R.O.C.; [3]Corresponding author, e-mail: tfhsieh@tari.gov.tw, Fax: +886-5-5820834)

This study was mainly focused on clarification of different diseases caused by three species of *Fusarium* in *Phalaenopsis*. According to field survey, pathogen isolation, identification and inoculation, the causal agents of different types of lesions such as yellow leaf, black spot and gray spot were verified. The pathogen *Fusarium solani* (teleomorph *Haematonectria haematococca*) caused yellow leaf of *Phalaenopsis* resulting in sheath and root rot, leaf yellowing and defoliation from sheath. Basal sheath exposed black rot symptom. In some cases, those parts of tissue displayed piles of orange-red perithecia. The pathogen *F. oxysporum* caused gray spot of *Phalaenopsis* resulting in leaves and sheaths appeared irregular to round dark brown lesion in the beginning, then lesion surrounded by a yellow halo and middle part of lesion turn gray color. If the leaf base or sheath of plants is infected by pathogen, the plants will show leaf yellowing symptom. The pathogen *F. proliferatum* caused black spot of *Phalaenopsis* resulting in circular to irregular shaped black lesions on sheaths and leaves. In some *Phalaenopsis* cultivars, the leaves turn yellowish after sheath was infected by this pathogen. For inoculation test, no yellow leaf symptom appeared on the plants after inoculation of the black spot isolates of F0217-23 and F925L7. But the tested plants showed yellow leaf symptoms after inoculation of the black spot isolates mixed with the sheath and root rot isolate of FST1. On the other hand, all test plants showed leaf yellowing after alone or mixed inoculation by FST1 and gray spot isolate of N8284. In addition, the inoculated plants showed leaf yellowing after mixed inoculation of the isolates FST1, F0217-23 and N8284. But the plants would not appear yellow leaf after mixed inoculation by the isolates F0217-23 and N8284. The mycelial growth of FST1 isolate was faster than F0217-23 and N8284 isolates. Mycelial growth rate of FST1 isolate was ranged from 4.8 to 5.3 mm/day, but F0217-23 and N8284 isolates were ranged from 2.1 to 3.3 mm/day at 24-28 ℃. From this study, the typical symptoms caused by three different species of *Fusarium* were clearly clarified. It will be helpful to recognize the confusable symptoms of *Phalaenopsis* diseases in the field.

Keywords: *Phalaenopsis*, yellow leaf, black spot, gray spot, *Fusarium solani*, *Haematonectria haematococca*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium proliferatum*